

Possibilité de production d'acide gamma linolénique par culture de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 sur quelques huiles végétales

G. AGGELIS⁽¹⁾, M.E. KOMAITIS⁽¹⁾, G. DIMITROULIAS⁽¹⁾, M. PINA⁽²⁾ et J. GRAILLE⁽²⁾

Résumé. — L'acide gamma linolénique (GLA) est un acide gras polyinsaturé, utilisé en pharmacie et en cosmétique dont les champignons Phycomycètes sont l'une des sources potentielles. Dans ce travail, nous avons étudié les possibilités de produire le GLA par biotransformation de l'acide linoléique de quelques huiles végétales à l'aide d'une souche de *Mucor* (*M. circinelloides* CBS 172-27). Dans ce but, nous avons déterminé la composition des glycérides cellulaires de cette souche au cours des différentes cultures effectuées sur des huiles contenant différentes proportions d'acide linoléique et d'acide α -linolénique. Le champignon, cultivé sur les différentes huiles, produit des quantités variables de GLA. La production de cet acide dépend de la richesse en acide linoléique du milieu de culture et est indépendante de la présence de l'acide α -linolénique. Le mycélium du champignon cultivé sur huile de tournesol contient plus de 65 % d'une huile à 17,4 % de GLA.

Mots-clés : Acide gamma linolénique, mucorales, huiles, organismes unicellulaires

INTRODUCTION

Le GLA est un acide gras de la série (n-6), obtenu par désaturation de l'acide linoléique grâce à l'action de la δ -6 désaturase (1,2,3). Chez l'homme, la δ -6 désaturation est l'étape limitante de toute la chaîne anabolique des séries n-3, n-6 et n-9. On comprend donc l'importance de cette activité (3,4) dont la réduction ou la suppression cause des dommages graves chez l'homme.

Le GLA est présent dans les lipides cellulaires des champignons Phycomycètes (5,6,7,8) ; ces microorganismes sont relativement riches en lipides (9,10) et sont donc des souches de choix pour développer une production industrielle d'Huiles d'Organismes Unicellulaires (HOU), riches en GLA (10,11,12).

Dans ce travail, nous avons étudié la cinétique d'accumulation du GLA dans les glycérides cellulaires d'une souche de *Mucor* (*M. circinelloides* CBS 172-27) au cours des différentes cultures effectuées sur quelques huiles contenant différentes proportions d'acide linoléique et d'acide α -linolénique.

Bioconversion de l'acide linoléique en GLA dans les réserves lipidiques de *Mucor circinelloides* : une approche théorique.

Dans des milieux de culture où l'huile constitue la seule source de carbone, les différents acides gras produits par hydrolyse des triglycérides sont, soit accumulés dans le my-

célium et biotransformés en autres acides gras, soit dégradés pour produire de la biomasse.

La biotransformation de l'acide linoléique en GLA dans le mycélium peut être schématisée dans la figure 1. La vitesse d'accumulation du GLA (V_a . GLA) peut être estimée pendant la croissance du champignon :

$$F_0 = V_a.C18:2 + Fp1 + F3$$

$$(V_a.C18:2 = \text{vitesse d'accumulation de C18:2})$$

$$F3 = V_a.GLA + Fp2$$

$$F_0 + F3 = V_a.C18:2 + V_a.GLA + Fp1 + Fp2 + F3$$

$$F_0 = V_a.C8:2 + V_a.GLA + Fp1 + Fp2$$

et donc

$$V_a.GLA = F_0 - [V_a.C18:2 + Fp1 + Fp2]$$

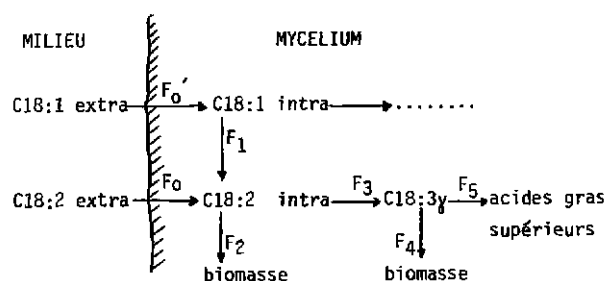
Dans des conditions données, en absence de facteurs limitants de la croissance du mycélium, les pertes totales ($Fp1 + Fp2$) sont dépendantes de la phase de croissance des microorganismes. Le facteur F_0 dépend de la richesse du milieu en lipides et de la concentration de l'acide linoléique dans ces lipides. Nous pouvons donc conclure que la vitesse d'accumulation du GLA ($V_a.GLA$) est positive dans le cas où $F_0 > V_a.C18:2 + Fp1 + Fp2$. Au contraire, si $F_0 < V_a.C18:2 + Fp1 + Fp2$, la vitesse $V_a.gla$ est négative et nous avons donc une dilution du GLA dans la biomasse du champignon.

Sur le plan pratique, le facteur sur lequel nous pourrions agir facilement, dans une certaine mesure, est le facteur F_0 qui dépend de la richesse du milieu en lipides et de la concentration de l'acide linoléique dans ces lipides. Nous avons étudié principalement l'effet de la concentration de l'acide linoléique dans les lipides du milieu sur l'accumulation du GLA dans les réserves lipidiques de *Mucor circinelloides*.

(1) Laboratoire des Industries Agroalimentaires - Université d'Agronomie d'Athènes, 75 Iera Odos, Votanikos, Athènes, Grèce

(2) Division Chimie des Corps Gras - IRHO/CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier, France

FIG.1. — Schéma hypothétique de la bioconversion de l'acide linoléique en GLA dans le mycélium des Phycomycètes



- FO' = Flux de C18:1 dans le mycélium
 FO = Flux de C18:2 " "
 F1 = Flux de C18:1 vers C18:2
 F2 = Vitesse de dégradation de C18:2
 F3 = Flux de C18:2 vers C18:3 (n-6)
 F4 = Vitesse de dégradation de C18:3 (n-6)
 F5 = Flux de C18:3 (n-6) vers les acides gras supérieurs
 F2-F1 = Fp1 (pertes de C18:2)
 F4+F5 = Fp2 (pertes de C18:3 (n-6))

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

La souche utilisée (*Mucor circinelloides*) provient du Central Bureau voor Schimmelcultures de Baarn (CBS 172-27). Cette souche est conservée à 4°C sur milieu PDA-Difco.

Milieu de culture

- Sels minéraux : phosphate monopotassique : 8 g/l ; chlorure de sodium : 0,1 g/l ; sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) : 0,5 g/l ; chlorure de calcium : 0,1 g/l ; nitrate d'ammonium : 3,6 g/l
- Extrait de levure : 5 g/l
- pH du milieu : 5,0

Les huiles de tournesol et de lin sont utilisées comme sources de carbone à une quantité de 10 g/l. Ces huiles sont respectivement choisies à cause de leurs richesses en acides linoléique et α -linoléique.

La contribution des deux huiles dans les différents milieux est donnée ci-dessous :

Huiles (g/l)	Milieux minéraux				
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
Lin	10,0	7,5	5,0	2,5	0,0
Tournesol	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0

Les compositions en acides gras des deux huiles sont les suivantes :

Huiles (g/l)	Acides gras					
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	autres
Lin	4,0	2,0	16,0	14,3	63,4	0,3
Tournesol	6,0	3,7	24,2	65,5	0,1	0,5

La stérilisation s'effectue à 120°C pendant 20 min.

Conditions de culture

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml remplis au 1/5ème de leur volume. Ces fioles sont soumises à un mouvement de va-et-vient d'une amplitude de 5 cm et d'une fréquence de 120 oscillations par min. Les différentes cultures sont effectuées dans une enceinte thermostatée à 28°C.

Techniques analytiques

La récolte de la biomasse et l'extraction de l'huile sont décrites dans une publication précédente [7]. La transformation de la matière grasse sous forme d'esters méthyliques s'effectue avec le méthylate de sodium et le méthanol chlorhydrique selon la méthode générale indiquée dans la norme AFNOR [13]. Les esters méthyliques sont repris par un volume connu d'hexane tel qu'on ait des solutions à 1 %. 1 μ l de solution est injecté dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse Hewlett-Packard 5700A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et relié à un intégrateur Hewlett-Packard 7123B. La séparation des constituants s'effectue à l'aide d'une colonne DEGS (1,83 m x 3 mm) ; 10 % sur chromosorb WHP, 100 à 200 mesh).

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- températures : injecteur 250°C, détecteur 250°C, four 180°C
- gaz vecteur : hélium à un débit de 14 ml/min.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

L'évolution des concentrations en acides gras linoléique (C18:2, n-6), α -linoléique (C18:3, n-3) et gamma linoléique (C18:3, n-6) dans les glycérides cellulaires est donnée respectivement dans les figures 2, 4 et 6.

L'acide linoléique (Fig. 2) s'accumule abondamment dans le mycélium de la souche étudiée. Cette accumulation s'accomplit durant les 23 premières heures pour les milieux les plus pauvres en acide linoléique (cas des milieux 75:25 et 100:0). Par contre, pour les milieux enrichis en acide linoléique (0:100, 25:75 et 50:50), l'accumulation se poursuit après le premier jour.

La concentration finale de l'acide linoléique dans les glycérides cellulaires représente 81,2 % de la concentration de cet acide dans les lipides du milieu (pente de courbe de la Fig. 3). Les mêmes remarques peuvent être formulées pour l'accumulation de l'acide α -linoléique dans la biomasse du

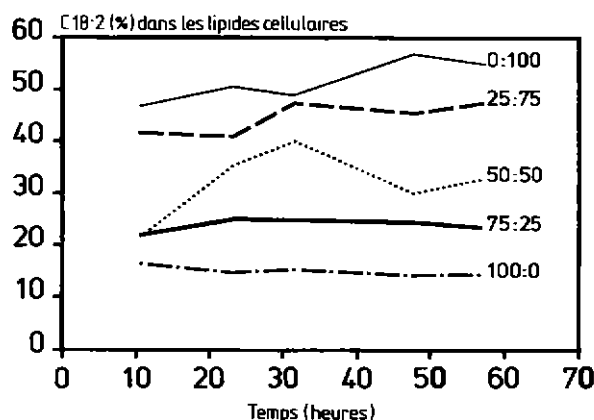


FIG. 2. — Accumulation de l'acide linoléique dans la biomasse de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 au cours des cultures effectuées sur les différents mélanges d'huiles

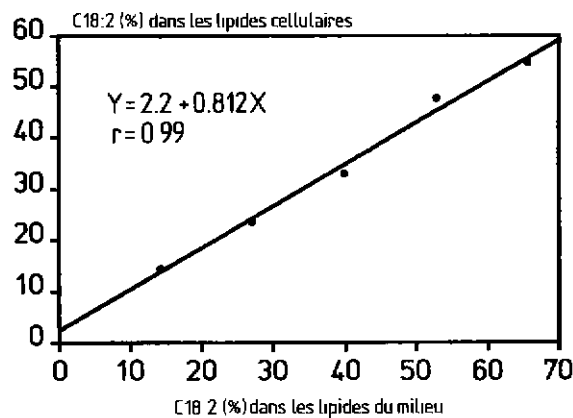


FIG. 3. — Accumulation de l'acide linoléique dans le mycélium de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 en fonction de la concentration de cet acide dans les lipides du milieu

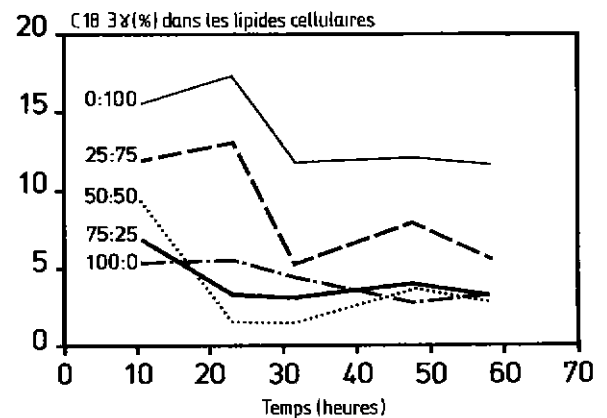


FIG. 6. — Evolution de la concentration du GLA dans les lipides du mycélium de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 au cours des cultures effectuées sur les différents mélanges d'huiles

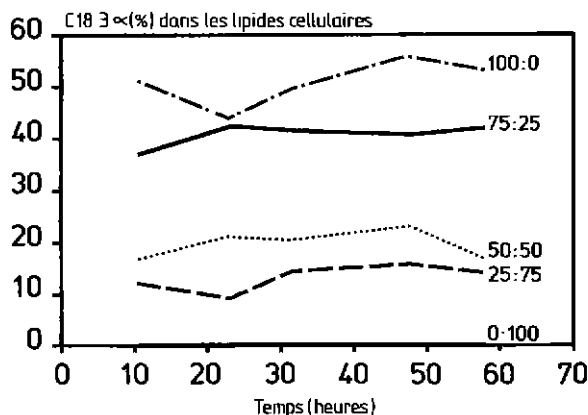


FIG. 4. — Accumulation de l'acide α-linolénique dans la biomasse de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 au cours des cultures effectuées sur les différents mélanges d'huiles

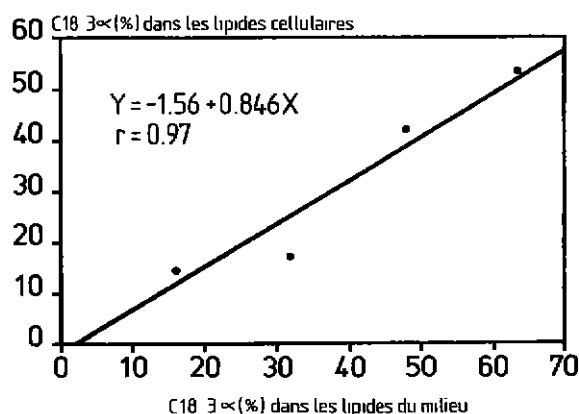


FIG. 5. — Accumulation de l'acide α-linolénique dans le mycélium de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 en fonction de la concentration de cet acide dans les lipides du milieu

champignon (Fig. 4). Comme dans le cas précédent, l'accumulation de l'acide α-linolénique est fonction de sa concentration dans les lipides du milieu (Fig. 5). Le champignon cultivé sur huile de tournesol (milieu 0:100) ne produit pas d'acide α-linolénique. Cet acide, retrouvé dans les autres cas dans la biomasse, provient donc d'une accumulation directe des lipides extracellulaires.

L'évolution de la concentration du GLA dans la biomasse du champignon est donnée dans la figure 6. Nous pouvons remarquer que le champignon cultivé sur les milieux 0:100 et 25:75 accumule au bout de 23 heures des quantités notables de GLA (respectivement 17,4 et 13,1 %). Il est évident, que pendant cette phase de croissance sur ces milieux riches en acide linoléique, le facteur F0, qui dépend de la richesse des lipides du milieu en C18:2, est supérieur à la somme de $Va.C18:2 + Fp1 + Fp2$ ce qui signifie que $Va.GLA > 0$. La vitesse d'accumulation pendant cette phase est égale à $17,4\% / 23\text{ h} = 0,76\%/\text{h}$ pour le milieu 0:100 et à $13,1\% / 23\text{ h} = 0,57\%/\text{h}$ pour le milieu 25:75.

Après 23 heures de culture, on constate dans les deux cas une dilution importante du GLA dans les lipides du mycélium. Ce phénomène peut être attribué à la diminution du facteur F0 à cause de la consommation du substrat par le microorganisme.

Nous avons donc $F0 < Va.C18:2 + Fp1 + Fp2$ et $Va.GLA < 0$. Compte tenu que la vitesse $Va.C18:2$ dépend du facteur F0, le déséquilibre $F0 < Va.C18:2 + Fp1 + Fp2$ doit être plus précisément attribué à la diminution du facteur F0 par rapport aux pertes ($Fp1 + Fp2$).

Dans le cas des milieux 50:50, 75:25 et 100:0, les lipides produits par le champignon sont moins riches en GLA. Il semble que le facteur F0 soit dès le début de la croissance trop faible pour couvrir les besoins énergétiques du microorganisme, à cause de la faible concentration de l'acide linoléique dans les lipides du milieu de culture. Pour la même raison, la vitesse d'accumulation est négative, ce qui entraîne une dilution du GLA dans les glycérides cellulaires.

Il semble que le système désaturase de la souche étudiée soit moins actif en présence des lipides extracellulaires. Le taux de bioconversion ($GLA/C18:2 + GLA$) qui donne une idée de l'efficacité du système δ-6 désaturase est égal à 0,6 dans le cas du glucose (10) et à 0,24-0,27 dans le cas des cultures effectuées sur les huiles. Ce rapport semble être indépendant de la présence de l'acide α-linolénique dans le milieu de culture (Tableau I) ; cette remarque est très intéressante dans le cas éventuel de la valorisation d'huiles végétales qui en sont plus ou moins pourvues. La biomasse du champignon contient dans le cas des milieux 0:100 et 25:75 respectivement 67,5 % et 65 % d'huile (Tableau II) et les productions en GLA sont respectivement de 470 et 341 mg par litre de milieu.

TABLEAU I. — Taux de conversion de l'acide linoléique en GLA (GLA/C18 : 2 + GLA) dans le mycélium de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 en fonction de la concentration de l'acide α -linoléique dans les lipides du milieu

Acide α -linoléique dans les lipides du milieu (%)	Taux de bioconversion (GLA/C18 : 2 + GLA)
0.0	0.26
9.3	0.24
44.0	0.27

TABLEAU II. — Production de GLA à partir de cultures de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 effectuées sur les milieux 0 : 100 et 25 : 75 pendant 23 heures

Milieu de culture	Récolte de biomasse (1)	Huile dans la biomasse (%)	GLA dans l'huile (%)	Production estimée de GLA (2)
0 : 100	4.0	67.5	17.4	470
25 : 75	4.0	65.0	13.1	341

(1) = exprimée en g/l de milieu

(2) = exprimée en mg/l de milieu

CONCLUSION

La bioconversion de l'acide linoléique en GLA a été étudiée dans le mycélium de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 : cette souche accumule très vite l'acide linoléique du milieu de culture. La concentration de cet acide dans les lipides mycéliens correspond aux 80 % de sa concentration dans les lipides du milieu. Le taux de bioconversion est égal dans le cas des cultures effectuées sur huile de tournesol à 0,27.

Il semble que le système δ -6 désaturase de *Mucor circinelloides* soit moins actif en présence des lipides extracellulaires. Il est pourtant possible d'obtenir de bons rendements en GLA en augmentant la concentration de l'acide linoléique dans les lipides du milieu de culture. Ainsi, *Mucor circinelloides* cultivé sur huile de tournesol accumule une huile riche en GLA (17,4 %) ce qui correspond à une production en GLA de 470 mg/l de milieu. De plus, la présence d'acide α -linoléique dans le milieu de culture n'inhibe pas la bioconversion de l'acide linoléique en GLA. La production du GLA est donc également possible à partir d'huiles contenant plus ou moins d'acide α -linoléique

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRENNER R.R., DETOMAS M.E. et PELUFFO R.O. —Effect of polyunsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of linoleic to gamma linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 640-642, (1965).
- [2] MARCEL Y.L., KRISTIANSEN K. et HOLMAN R.T. —The preferred metabolic pathway from linoleic acid to arachidonic acid in vitro *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, 25-34, (1968)
- [3] BRENNER R.R. —Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids *Prog. Lipid Res.*, **20**, 41-46, (1981).
- [4] PELUFFO R.O. et BRENNER R.R. —Influence of dietary protein on δ -6 desaturation of fatty acids in rats of different ages and in different seasons. *J. Nutrition*, **104**, 894-900, (1974).
- [5] SHAW R. —The occurrence of gamma linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 230-277, (1965).
- [6] RATLEDGE C. —Lipid products of metabolism. *Economic Microbiology*, (ed. ROSE A.E.) Academic Press, vol. 2, p. 263-302, (1978).
- [7] AGGELIS G., PINA M., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GRAILLE J., GALZY P., MARTIN-PRIVAT P. et PERRAUD J.P. —Production d'huiles riches en acide gamma linoléique par diverses souches de Phycomycètes. *Oléagineux*, **42**, 379-386, (1987)
- [8] AGGELIS G., PINA M. et GRAILLE J. —Localisation de l'acide gamma linoléique dans les mycéliums et dans les spores chez deux *Mucorales*. *Oléagineux*, **45**, 229-232, (1990)
- [9] AGGELIS G., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GALZY P., MARTIN-PRIVAT P., PERRAUD J.P., PINA M. et GRAILLE J. —Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de *Mucor*. *Oléagineux*, **43**, 311-317, (1988).
- [10] AGGELIS G. —Etude de la production d'acide gamma linoléique par des phycomycètes (*Mucorales*). Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Montpellier II-USTL, (1989).
- [11] FUKUDA H. et MORIKANA H. —Enhancement of gamma linolenic acid production by *Mucor ambigus* with nonionic surfactants. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **27**, 15-20, (1987).
- [12] HANSSON L. et DOSTALEK M. —Effect of culture conditions in mycelial growth and production of gamma linolenic acid by the fungus *Mortierella ramaniana*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **28**, 240-246, (1988).
- [13] AFNOR —Recueil de Normes Françaises des Corps Gras - Graines Oléagineuses et Produits Dérivés. 3ème éd. NTT, **95**, 60-233, (1984)

SUMMARY

Possibility of gamma linolenic acid production by culturing *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on some vegetable oils

G. AGGELIS, M.E. KOMAITIS, G. DIMITROULIAS, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1991, **46**, N° 5

Gamma linolenic acid (GLA) is a polyunsaturated fatty acid, used in pharmacy and cosmetics, which can be derived from phycomycetes fungi. In this study, we looked at the possibility of producing GLA by biotransformation of the linoleic acid in some vegetable oils, using a *Mucor* strain (*M. circinelloides* CBS 172-27). To this end, we determined the cellular glyceride composition of the strain during different culturing operations on oils containing different proportions of linoleic and α -linolenic acid. The fungus, cultured on various oils, produces varying amounts of GLA, depending on

RESUMEN

Posibilidad de producir ácido gamma linoléico al cultivar *Mucor circinelloides* CBS 172-27 en algunos aceites vegetales

G. AGGELIS, M.E. KOMAITIS, G. DIMITROULIAS, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1991, **46**, N° 5

El ácido gamma linoléico (GLA) es un ácido graso poliinsaturado, utilizado en farmacia y en cosmética cuyos hongos ficomicetos son una de las fuentes potenciales. En este trabajo, hemos estudiado las posibilidades de producir el GLA por biotransformación del ácido linoléico de algunos aceites vegetales con la ayuda de una cepa de *Mucor* (*M. circinelloides* CBS 172-27). Con este fin, hemos determinado la estructura de los glicéridos celulares de esta cepa en el transcurso de los varios cultivos efectuados sobre aceites conteniendo varias proporciones de ácido linoléico y ácido α -linoléico. El hongo,

the linoleic acid content of the culture medium, but irrespective of the α -linolenic acid content. The mycelium of the fungus cultured on sunflower oil contains more than 65% oil with a GLA content of 17.4%.

cultivado sobre varios aceites, produce cantidades variables de GLA. La producción de este ácido depende de la riqueza en ácido linoléico del ambiente de cultivo y es independiente de la presencia de ácido α -linolénico. El micelio del hongo cultivado sobre aceite de girasol contiene más de 65% de un aceite al 17,4% de GLA.



DECHETS D'HUILE DE PALME = ECOLOGIQUE ENERGIE ECONOMIQUE

Chaudière combinée tubes d'eau - tubes de fumées: conception robuste et fiable avec accessibilité facile et maintenance simple.

Alimentation par vis: combustion stable et complète.

Décendrage par grilles basculantes.

Mise en préfab dans nos ateliers: assemblage simple sur place.

capacités
0,5 à 20 tonnes/h

vyncke sa
gentsesteenweg 224
b-8530 harelsbeke - belgique
tél 32/56 71 82 31
fax 32/56 70 41 60

Plus de 900 références en combustibles solides.

artex